

**2013**

**GUIA DE LABORATORIO DE  
TOXICOGENOMICA Y  
TOXICOLOGIA MOLECULAR.**

**Javier del Pino Sans**

**Paula Moyano-Cires Ivanoff**

**ISBN: 978-84-616-5863-3**

# **GUIA DE LABORATORIO DE TOXICOGENOMICA Y TOXICOLOGIA MOLECULAR.**

## **INDICE**

### **1. PREPARACION DE EQUIPAMIENTO LIBRE DE RNASAS**

### **2. PROCEDIMIENTO QUIRURGICOS PARA PEQUEÑOS ANIMALES**

#### **2.1. Ovariectomía**

#### **2.2. Orquidectomía**

#### **2.3. Implantación de capsulas Silastic**

##### **2.3.1. Preparación de las capsulas**

#### **2.4. Canulacion yugular y muestreo secuencial de sangre**

##### **2.4.1 Preparación de la cánula**

### **3. HIBRIDACION *IN SITU* HISTOQUIMICA (ISHH)**

#### **3.1. Preparación de transcritos de ADNc**

##### **3.1.1 Diseño de Primers**

##### **3.1.2. Extracción de ARN**

##### **3.1.3. Reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa (RT-PCR)**

##### **3.1.4. Preparación de geles de Agarosa**

##### **3.1.5. Corte de bandas y re-PCRing**

##### **3.1.6. Clonación con vectores TOPO y transformación bacteriana**

##### **3.1.7. Preparación de plásmidos y de stocks de glicerol**

##### **3.1.7.1. Inoculación de medios de cultivo**

3.1.7.2. Uso de Nanodrop para determinar la concentración y el ratio 260/280

3.1.7.3. Uso de enzimas de restricción

3.1.7.3.1. Digestión típica analítica (para determinar la orientación o para verificar la presencia de un inserto)

3.1.7.3.2. Digestión típica analítica (para la linealización de muestras de ADN)

3.1.7.3.3. Limpieza del digerido por las enzimas de restricción

### **3.1.8. Transcripción *in vitro* de sondas de ARNc 18**

3.1.8.1 Calculo de la cantidad de nucleótidos radioactivos para la reacción de transcripción

3.1.8.1.1. Transcripción con el 100% de nucleótidos radiomarcados

3.1.8.1.2. Transcripción con aproximadamente 80% de radionucleótidos

3.1.8.2. Transcripción *in vitro* de sondas radioactivas

3.1.9. Transcripción *in vitro* de sondas marcadas con digoxigenina

3.1.9.1. Evaluación de las sondas marcadas con digoxigenina

3.1.9.2. Marcado de sondas de oligodeosinucleotidos

## **3.2. Prehibridación**

## **3.3. Hibridación**

3.3.1. Preparación de Buffer de hibridación para Hibridación In Situ con sondas de ARNc

3.3.2. Preparación de Buffer de hibridación para Hibridación In Situ con sondas de Oligodeoxinucleotidos

3.3.3. 20XSSC

3.3.4. 10XPBS

## **3.4. Lavados post-hibridación para sondas de ARNc**

**3.4.1. Lavados post-hibridación al utilizar sondas de oligodeoxinucleotidos**

## **3.5. Detección con anticuerpos de sondas marcadas con digoxigenina**

3.5.1. Detección sin tiramida biotinilada

3.5.2. Amplificación con tiramida biotinilada

### **3.6. Autoradiografía**

3.6.1. Autoradiografía de rayos-X

3.6.2. Emulsión autoradiográfica

## **4. CULTIVOS CELULARES**

### **4.1. Preparación de medio de cultivo**

4.1.1. Extracción de componente del suero con resina

4.1.2. Extracción de componentes del suero con carbón activo

### **4.2. Pase de células**

### **4.3. Descongelación de células**

### **4.4. Ensayo para la medida de la actividad transcripcional**

4.4.1. Búsqueda de secuencias en las regiones promotoras de los genes

4.4.2. Construcción de plásmidos

4.4.3. Transfecciones transitorias

4.4.4. Ensayo dual de la luciferasa

## **5. IMMUNOHISTOQUIMICA**

### **5.1. Fijación por perfusión**

5.1.1. Reactivos

5.1.2. Equipamiento

5.1.3. Preparación

## **6. RADIOINMUNOENSAYO**

### **6.1. Procedimiento de ensayos de LH**

6.1.1. Soluciones de radioinmunoensayo de LH

6.1.2. Solución LH RIA

- 6.1.3. Preparación de curva standard kit LH RIA
- 6.1.4. Protocolo para 500- $\mu$ l RIA
- 6.1.5. Diluciones de anticuerpos de LH
- 6.1.6. Diluciones de CSU 120 de anticuerpos de LH
- 6.1.7. Procedimiento para ensayo de 500- $\mu$ l
- 6.1.8. Procedimiento para ensayo de 1000- $\mu$ l

## 1. Preparación de equipamiento libre de ARNsas

1. **Soluciones:** Excepto soluciones que contienen TRIS, añadir 1 ml de pirocarbonato de dietilo (DEPC) a cada litro de líquido. Agitar bien para que tapa de la botella también sea tratada. Permitir que la solución este en reposo una noche en la campana, después autoclavar la solución para la descomposición de DEPC hasta etanol y agua.

2. **Los recipientes de plástico de hibridación:** Poner 1 ml DEPC / litro en agua desionizada, destilada y llenar los recipientes de hibridación a lo máximo posible (poner la bandeja en la campana). Cubra con papel de aluminio los recipientes. Permita reposar durante la noche en la campana, luego volcar el agua y cubrir los recipientes con papel de aluminio. Autoclave.

3. **Cristalería y utensilios metálicos:** Tapar las bocas de los contenedores con papel de aluminio y también envolver los utensilios de metal en papel de aluminio. Hornear a 180 ° C durante al menos 4 horas. Dejar enfriar y guardar.

4. **Varios:** Siempre use guantes al manipular objetos libres de RNAsas, porque las manos están contaminadas con RNAsas. Una vez en contacto con los guantes con una superficie que no está libre de RNAsas, deben ser considerados contaminados.

## **2. Procedimientos quirúrgicos en pequeños animales**

### **Preparación General**

Lavar el instrumental quirúrgico, enjuagar con etanol y dejar secar. Envolver el mismo en papel de aluminio y autoclavar antes del uso. Calentar esterilizador de perlas de vidrio para el uso su uso durante la cirugía. Colocar papel absorbente sobre la mesa de cirugía limpia y abrir los pack de instrumental (con guantes y mascarilla).

Para todos los procedimientos quirúrgicos, los animales se anestesian con isoflourano (inhalación para la ovariectomía, orquidectomía, o la implantación de cápsulas de silastic) o ketamina / xilazina (100 mg/kg/ 0.6 mg/kg ip para la canulación yugular o cirugías estereotáxicas) hasta que pierden elreflejo pedal y la tasa respiratoria es lenta y regular. Afeitar la zona de la piel con maquinilla de afeitar eléctrica, entonces preparar la piel de tratándola con Betadine. Proceder tal como se describe a continuación. Rellene las hojas quirúrgicas y observar ausencia de sangrado de los animales durante al menos una hora después de que se despierte de la anestesia.

### **2.1. Ovariectomía**

Con unas tijeras, hacer incisiones de  $\frac{1}{4}$  de pulgada en el flanco bilateral aproximadamente a  $\frac{3}{8}$  pulgadas por encima de los huesos de la cadera. Utilizando una pinza de dientes de rata, coger el músculo justo debajo de la incisión. Hacer un pequeño corte en el músculo y agrandar la abertura utilizando disección roma con una pinza hemostática. Alcanza con pinzas curvas de mosquito el ovario y útero y sacarlos fuera. Rodear y hacer nudo de corbata doble de sutura de seda alrededor del útero. Sosteniendo el ovario y lagrassa asociada, cortar justo por encima de la sutura, dejando suficiente tejido para que la sutura no se deslice. Agarrar un lado de la incisión en el músculo con

pinzas de dientes de rata y permitir que la parte restante del cuerpo uterino se retraiga en la cavidad retroperitoneal. Suturar el músculo con un solo punto de sutura de seda. Cerrar la herida con clip de acero inoxidable para heridas.

## **2.2. Orquidectomía**

Con unas tijeras, hacer pequeña incisión en el saco escrotal. Hacer un agujero en el tejido que rodea el testículo, extraer el testículo a través de este agujero y sacarlo al exterior. Usando sutura de seda, hacer un nudo de corbata doble alrededor del cordón espermático, vesículas espermáticas y los conductos deferentes. Cortar el testículo. Cerrar la herida con grapas para heridas.

## **2.3. Implantación de capsulas Silastic**

(Generalmente implantar una semana después de la ovariectomía)

Afeitar dorso anterior y medial de la incisión de la ovariectomía. Hacer a 1/8 pulgadas incisiones bilaterales justo laterales a la línea media. Usar una pinza pequeña hemostática y disección roma para hacer un bolsillo de la longitud de la cápsula. Insertar una cápsula y cerrar con clip de acero inoxidable la herida, asegurándose de que la incisión esté bien cerrada. Repetir del otro lado.

### **2.3.1. Preparación de las capsulas**

- ❖ Usar tubos de Silastic de medida 0.062 i.d. y 0.125 o.d.
- ❖ Cortar piezas de 3 cm de largo (usando regla de plástico y recortes)
- ❖ Poner palillos de madera de color naranja en el extremo (aproximadamente 2 mm). Marcar el palillo naranja con una cuchilla y presionar ligeramente en la cápsula. Romper el palillo, asegurándose que no haya nada que sobresale desde el extremo (si sobresale algo, una reacción del tejido puede producirse e interferir con la liberación de la hormona de la cápsula).



- ❖ Inyectar estradiol en aceite de sésamo (200 µg/ml) usando una aguja del calibre 21 encajada entre la madera y el tubo de Silastic.
- ❖ Guardar la solución de estradiol (200 µg/ml) temperatura ambiente.

## **2.4. Canulación yugular y muestreo secuencial de sangre**

Colocar la rata sobre el dorso con la nariz dirigida hacia el frente. Inmovilizar las patas delanteras pegándolas suavemente con cinta adhesiva para trabajar sobre la superficie y colocar cinta adhesiva sobre el rostro de modo que la piel del cuello quede tensa. Hacer una incisión vertical pequeña con bisturí justo debajo de línea de la mandíbula. Con disección roma, diseccionar la vena yugular que recubre el músculo. Aislar la vena y la fascia clara que la rodea. Hacer un bucle de sutura bajo la vena y cortar la sutura en medio. Atar la sutura distal al corazón (la sutura más cercana a la cabeza) y hacer un nudo muy suelto en la sutura proximal. Usando unas tijeras de iris, hacer un corte en la vena. Adjuntar una cánula de polietileno a una jeringa llena de solución salina heparinizada utilizando una aguja de calibre 21. Rellenar la cánula con la solución salina y retirar la aguja. Insertar una cánula a la primera marca. Se debe obtener un retorno de la sangre bueno. Atar en su lugar con el hilo de sutura proximal.

Afeitar la base del cuello y hacer una pequeña incisión. Utilizando una pinza hemostática curva y disección roma, hacer un bolsillo desde el cuello hasta la incisión posterior. Enhebrar la cánula a través de esta cavidad y exteriorizar a través de la incisión. Poner la aguja en el extremo del hilo de seda conectado a la cánula con pegamento y suturar a través de la piel. Hacer lo mismo con el otro hilo. Atar los cabos y cerrar la incisión alrededor de la cánula. Asegurarse de que la cánula está permeable y enjuagar con 0,2 ml de solución salina heparinizada. Dejar cosido un pasador en el extremo de la cánula. Para obtener muestras seriadas de sangre, inyectar 0,1 ml de solución salina.

### **2.4.1 Preparacion de la canula**

Cortar tubos de polietileno intramedic (PE50) (Becton-Dickinson, Cat. #7410, Clay Adams) en longitudes de 11-cm. Hacer una marca a 3 cm desde un extremo y 4cm desde el otro. Usar superglue para colocar un nudo de seda a 4 centímetros de la marca.

## **3. Hibridizacion In Situ Histoquimica (ISHH)**

### **3.1. Preparación de transcritos de ADNc**

#### **3.1.1 Diseño de Primers**

Antes de proceder al diseño de primers buscar en la literatura si hay ya primers validados para el gen de interés en la especie de interés. Si no es así, existen diversas webs que diseñan primers para ti.

##### **a. Ir a: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)**

Buscar en la web por Nucleotide por la secuencia del gen de interés

Hacer clic en la especie de interés

Hacer clic en el número de acceso del Genbank a la izquierda de la representación gráfica de la secuencia

Ir a FASTA

Pinchar en pick up primers

Fijar los parámetros de tamaño GC, etc. y obtenemos así los primers.

Asegurarse de que no hay largos tramos de secuencias homólogas a otros genes (en las especies de interés), excepto el que se desea

##### **b. Pedir primers: IDT**

### **3.1.2. Extracción de ARN**

Agitar la pipeta en movimientos verticales para disgregar el tejido rápidamente

Añadir 950 µl de Trizol y agitar.

Añadir 200 µl de cloroformo y agitar. Dejar asentar durante dos minutos

Seguir las instrucciones del Kit

Para cultivos de células o muestras grandes, utilizar Trizol (Invitrogen) y seguir las instrucciones del fabricante en la web.

Para punches u otras aplicaciones que utilizan pequeñas cantidades de tejido, usar ARN LipidEasy. A continuación, utilizar Qiagen kit con Trizol.

Homogenizar el tejido en 50µlTrizol en un tubo de 1,5 ml libre de RNasas con un mortero.

Pipetear hacia arriba y hacia abajo con fuerza para romper rápidamente el tejido

Añadir 950µl de Trizol (en lugar de Qizol) y agitar

Añadir 200 µl de cloroformo y agitar. Dejar reposar durante 2 min.

Seguir las instrucciones en el kit.

### **3.1.3. Reacción en cadena de la transcriptasa-polimeras reversa (RT-PCR)**

Para cultivos celulares, usar el kit Promega RT y las instrucciones del fabricante. Se debe partir por lo menos 2 microgramos de RNA.

Para punches, utilizar el kit QuantiTect reverse transcriptase (Qiagen) y las instrucciones del fabricante.

#### **a. Preparación de los Primers**

Resuspender los primers en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a una concentración de 0,1 nM / µl (= 100 µM).

Hacer una dilución de 20 µM para cada primer (10µl de 100 µM + 40µl de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas).

Descargar protocolos de los fabricantes.

## **b. Reacción de PCR**

Usar Promega GoTaq o GoTaqFlexi (no MgCl<sub>2</sub>)

En primer lugar calcular cuantas reacciones se van a hacer.

A continuación, hacer mezcla stock. Para hacer gradientes de MgCl<sub>2</sub>, primero hacer la mezcla stock y luego hacer alícuotas y añadir a cada una la concentración de MgCl<sub>2</sub>. Utilizar 2,5 mM (1X).

### **Notas:**

- 1) Realizar una electroforesis del producto de la PCR sobre un gel de agarosa (1% en general).
- 2) Si utiliza GenElute y clonación TopoTA, se puede dejar el ADN en TBE. No es necesario realizar la extracción orgánica o precipitaciones de etanol.

### **Para usar el termociclador:**

- 1) Encender (interruptor en la parte trasera)
- 2) En el menú principal, ir a los archivos [enter]
- 3) Cargar [enter]
- 4) Ir a programar y editar según sea necesario.
- 5) Gradiente es de izquierda a derecha (más frío más caliente a); gradiente no es uniforme, debe fijar los tubos de este lugar y en consecuencia (izquierda, Display digital "Opciones").
- 6) Poner en la muestra y cerrar la tapa hasta el primer tope.

### 3.1.4. Preparación de geles de Agarosa

- 1) Para la separación de ADN de peso molecular alto (plásmidos cortados y sin cortar), usar 0,8% (peso / volumen) de gel de agarosa. Para la separación de las muestras de peso molecular más bajos (menos de 600), utilizar 1,2 a 2,0% de agarosa (dependiendo del tamaño esperado de la banda).
- 2) Poner agarosa en el matraz, añadir 25 ml (cubeta pequeña), 100 ml (para medianas y grandes) de TBE y calentar en el microondas (cubierto con papel film) el tiempo suficiente para disolver agarosa (tener cuidado de no hervir o se perderá agua y se hará un gel más concentrado).
- 3) Añadir 3µl de Gel Red y mezclar por agitación, evitar burbujas.
- 4) Verter el gel sobre la cubeta de electroforesis y colocar los peines dejando enfriar hasta que el gel esté solidificado. Retirar el gel y realizar la electroforesis con el mismo buffer que se ha usado para hacer el gel.

### 3.1.5. Corte de las bandas y Re-PCRing

Usando una espátula de punta roma, cortar la banda de interés y usar una columna de centrifugación de agarosa GenElute para eluir como se describe a continuación y en el prospecto:

- 1) Situar la columna de centrifugación GenElute en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 2) Pre-lavar la columna mediante la adición de 100µl 1TE (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) o agua a la columna de centrifugación.
- 3) Tapar y centrifugar la columna GenElute a la velocidad máxima de una microcentrífuga (12.000-16.000 xg) durante 5-10 segundos.

**Nota:** La columna debe dejarse secar después del pre-lavado. Evitar realizar el prelavado demasiado pronto antes de su uso o la centrifugación de la solución de prelavado durante más de 10 seg.

4) Desechar el eluido de lavado o transferir la columna GenElute a un tubo de colección nuevo.

5) Cortar la banda de interés del gel de agarosa (usar una espátula no una cuchilla) y cargar la porción de gel en la columna de pre-lavado.

**Nota:** Para obtener resultados óptimos, recortar el trozo lo más cerca posible a la banda de ADN.

Esto elimina el tener que procesar mucha agarosa y mantiene el ADN más concentrado. Ver en la

**Descripción del Producto** la información sobre la capacidad máxima de corte de gel.

6) Centrifugar la columna GenElute a la velocidad máxima de 10 min. El ADN purificado se encuentra en el tubo de recolección y está listo para usar. El ADN se puede almacenar a 2-8C o -20C.

7) Se puede utilizar 4µl de este eluato como ADNc, en lugar de realizar una reacción de RT.

### **3.1.6. Clonación en vectores TOPO y transformación de bacterias**

Usar el kit de clonado TOPO TA para ambos procesos.

1) Llenar un vaso con hielo. Colocar un vial de bacterias E. coli competentes transformadas en el hielo hasta que se descongele. (Las bacterias competentes se mantienen a -80 ° C).

2) Si se usa medio SOC en el paso 6, sacar el medio del congelador de -20C y dejar calentar hasta que llegue a temperatura ambiente. Si no hay suficiente SOC que viene con el kit, use LB.

3) En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, mezclar 1.5-2.0 µl de producto de PCR y 0,5µ l de vector TOPO. Mezclar suavemente e incubar de 30 segundos a 30 minutos (generalmente 5 minutos a temperatura ambiente).

4) Añadir 2µl de la reacción del paso 3 a las bacterias descongeladas. Mezclar muy suavemente dando pequeños golpes. NO vortexear. Las bacterias son frágiles. Incubar las bacterias en hielo de 5 a 30 minutos (normalmente 10 minutos).

5) Calentar las células durante 30 segundos a 42 ° C sin agitación. Este tiempo es crítico.

6) Añadir 250µl de medio SOC a temperatura ambiente a las bacterias. Tapar fuertemente el tubo, y pegar este con cinta al agitador de 37°C. Agitar a 37 °C (250 rpm) durante 1 hora (se puede usar medio LB en lugar de SOC, pero no debe contener ampicilina).

7) Justo antes de sacar las células del agitador, preparar una placa de cultivo para cada tubo de bacterias transformadas. Extender 50-75µl X-Gal en la placa de la forma más uniforme posible.

8) Retire las bacterias del agitador. Extender entre 10µl y 90µl de bacterias muy uniformemente en las placas preparadas. Tapar las placas y colocar boca abajo en la incubadora a 37°C. Dejar incubar la placa durante la noche.

9) Al día siguiente, la placa debe contener una mezcla de colonias de color azul y blanco. Las colonias azules son bacterias que contienen el vector TOPO sin el inserto. Las colonias blancas contienen bacterias que han tomado vector con el inserto. Se debe esperar un número relativamente pequeño de colonias blancas.

Nota: Si se desea transformar bacterias con un vector conocido (por ejemplo, un plásmido que alguien más ha hecho, probado y enviado a usted), el procedimiento es similar.

Eliminar el paso 3, y, en el paso 4, añadir aproximadamente 10 ng del plásmido para el vector (llevar a un volumen de 2.5µl con agua libre de nucleasas).

Para hacer X-Gal: Disolver 2,0% X-Gal en N, N-dimetilformamida.

### **3.1.7. Preparaciones de plásmidos y stocks de glicerol**

#### **3.1.7.1. Inoculación de medios de cultivo**

Para usar en el kit midiprep, poner 25 ml de medio LB + ampicilina en un matraz Erlenmeyer estéril de 250 ml (poner en la llama el labio del matraz antes y después de pipetear). Inocular al final del día, cubrir ligeramente con papel aluminio estéril la boca del matraz y colocar éste en el agitador-incubador a 37 ° C y 250 rpm durante aproximadamente 16 horas.

Sacar 500 µl de bacterias preparadas y poner en un criovial y añadir 500 µl de glicerol (100%). El stock de glicerol debe ser de al menos 50% glicerol para almacenamiento a largo plazo. Aislar plásmidos a partir de cultivos bacterianos de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por los fabricantes de los midiprep Qiagen o kits Midiprep. Determinar la concentración y la pureza de la muestra mediante la determinación del ratio 260/280 (usar 260 para determinar la concentración). Calcular la concentración de ADNc usando un factor de multiplicación, usar 25 para ADN y 20 para el ARN.

#### **3.1.7.2. Uso de Nanodrop para determinar la concentración y el ratio 260/280**

- 1) Pinchar en el icono de ND y abrir la aplicación.
- 2) Limpiar el pedestal del ND con una toallita de papel seca.
- 3) Poner 1,3 µl de agua en el pedestal y cerrar la tapa.
- 4) Limpiar el pedestal.
- 5) Hacer el blanco con 1,3 µl de TE o el diluyente de la muestra de ADN.
- 6) Seleccionar "ADN" en el menú.
- 7) Poner 1,3 µl de la muestra y medir la concentración.



### **3.1.7.3. Uso de enzimas de restricción**

#### **Notas introductorias:**

- 1) Usar 5 unidades de enzima por microgramo de ADN.
- 2) Es importante no exceder el 5% de glicerol en una digestión. Las enzimas se suministran en glicerol al 50%, lo que significa que el volumen total de la reacción debe ser al menos 10 veces la cantidad de enzima añadida.
- 3) Siempre mantener el stock de enzimas en frío, ya sea en hielo o en las cajas refrigeradas.
- 4) Buscar para cada enzima individualmente para obtener más información en los catálogos de la empresa (Promega y New England Biolabs, especialmente).

#### **3.1.7.3. 1. Digestión típica analítica (para determinar la orientación o para verificar la presencia de un inserto)**

- 1) A tubos snaptop de microcentrífuga de 1.5 ml añadir:
  - Agua libre de nucleasas, para hacer que el volumen total sea 10µl (Añadir esta primero al tubo)
  - 0,5 µg de ADN
  - 1.0µl de Tampón 10X (específico para cada enzima)
  - 1.0 µl de BSA 10X
  - 0.5µl de enzimas de restricción (siempre añadir las enzimas al final)
- 2) Mezclar con un movimiento rápido o pipeteando arriba y abajo. Asegurarse de que todo el líquido se queda en la parte inferior del tubo mediante una breve centrifugación.
- 3) Incubar una hora a la temperatura adecuada (casi siempre 37 ° C, pero el revisar catálogo).
- 4) Alicuotar 2 µl de ADN 5X colorante de carga (que viene con ladder) sobre parafilm para cada muestra.

- 5) Tomar 8  $\mu$ l de muestra y mezclar con el punto de 2  $\mu$ l de colorante de carga.
- 6) Pipetear en los pocillos de un gel de agarosa como se ha descrito anteriormente.

### **3.1.7.3. 2. Digestión típica analítica (para la linealización de muestras de ADN):**

1) Mezclar:

-20 microgramos de ADN

-10 $\mu$ l 10X Buffer específico para enzimas

-1 $\mu$ l 100X BSA (o 10 $\mu$ l 10X BSA)

-Agua libre de nucleasas para hacer que el volumen final sea de 100 $\mu$ l

2) Retirar y guardar 2 $\mu$ l para un carril de gel "sin cortar".

3) Se añaden 100 unidades de enzima de restricción.

4) Mezclar por volteo o pipeteando arriba y abajo, y asegurarse de que todo el líquido se queda en la parte inferior del tubo mediante una breve centrifugación.

5) Se incuba de 1 a 3 horas a la temperatura apropiada (generalmente 37 ° C, pero si no se está seguro, comprobar el catálogo).

6) Electroforesis de 2 $\mu$ l (aproximadamente 1,0  $\mu$ g) de la digestión en gel de agarosa al 0,8% en un carril próximo a una muestra de ADN "sin cortar" (2 $\mu$ l) para la comparación. Añadir 1 $\mu$ l de colorante de carga al tubo. Dejar el resto de la digestión incubando a la temperatura de digestión mientras se corre el gel.

Si el gel se ve bien, proceder a la limpieza del digerido por las enzimas de restricción.

### **3.1.7.3. 3. Limpieza del digerido por las enzimas de restricción:**

1) Para limpiar el digerido, añadir:

Un volumen igual de fenol / cloroformo

Vortexear a fondo

- 2) Centrifugar 2 minutos a velocidad máxima en la centrífuga
- 3) Retirar la parte superior (acuosa) a un tubo limpio
- 4) Añadir un volumen igual de cloroformo
- 5) Vortexear el centrifugado y guardar la capa acuosa como anteriormente
- 6) Añadir un décimo de volumen de NaCl 4 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100%
- 7) Enfriar 5 minutos o más en hielo.
- 8) Centrifugar a velocidad máxima durante 20 minutos a 4°C.
- 9) Decantar inmediatamente el líquido vertiendo cuidadosamente en tubo de 1,5-ml.
- 10) Invertir el tubo sobre Kimwipe y dejar secar el pellet.
- 11) Resuspender en 15µl.
- 12) Verificar la concentración por espectrofotometría (DO260)

### **3.1.8. Transcripción *in vitro* de sondas de ARNc**

En general, la señal de fondo de los autorradiogramas es menor si se utilizan sondas de nucleótidos que contienen entre el 50-80% de radionucleótidos, siendo el resto nucleótidos no marcados. Si se tiene una baja concentración de ARNm, se puede utilizar 100% de los nucleótidos marcados.

En el SpeedVac reducir el volumen lo suficiente de los nucleótidos UTP y CTP radiomarcados (en tubo de rosca) para alcanzar una concentración final de 12 µM de nucleótidos (marcados y no marcados) en los 10µl de reacción. Nunca dejar secar en posición high del SpeedVac y realizarlo en el menor tiempo posible. No permitir que se seque por completo. Se está tratando de reducir el volumen de modo que se puede utilizar el material en una reacción de transcripción 10µl.

Debido a que la actividad específica de cada lote de marcador radiactivo es diferente, se debe calcular el volumen que se requiere reducir (sobre la base de la concentración de nucleótidos que aparecen en las especificaciones del paquete) tal como se describe a continuación.

### **3.1.8.1. Cálculo de la cantidad de nucleótido radiactivo para reacciones de transcripción**

#### **3.1.8.1. 1. Transcripción con el 100% de nucleótidos radiomarcados:**

Para  $^{33}\text{P}$ :

Ejemplo de cálculo:

Se quiere (12  $\mu\text{M}$  de concentración final) (10 $\mu\text{l}$  volumen de reacción total) = (5 $\mu\text{M}$  \*) (x)

\*Se parte de una solución 5 $\mu\text{M}$  según la hoja de datos técnicos o la etiqueta del envase de  $^{33}\text{P}$  (2000

Ci/mmol, 10 mCi/ml; por lo tanto 1mmol/2000 Ci x 10 mCi/ml x Ci/1000 mCi = 10

mmol/2.000.000ml = 5 mmol/1000L x 1000  $\mu\text{mol}$ /mmol = 5 moles/L = 5  $\mu\text{M}$ )

Para  $^{35}\text{S}$ :

Ejemplo de cálculo:

Se quiere (12  $\mu\text{M}$  de concentración final) (10 $\mu\text{l}$  de volumen de reacción total) = (9.1 $\mu\text{M}$ ) \*\* (x)

X = 13.2 $\mu\text{l}$  deben de ser reducidos el volumen.

\*\* Depende de la actividad específica del isótopo

#### **3.1.8.1.2. Transcripción con aproximadamente 80% de radionucleótidos:**

Reducir el volumen de la solución de los nucleótidos radiactivos (se desea 10  $\mu\text{M}$  de concentración final de radionucleótidos y nucleótidos no marcados 2 $\mu\text{M}$ ) como se describe anteriormente.

### 3.1.8.2. Transcripción *in vitro* de sondas radioactivas

1) En el tubo en el que se ha reducido el volumen de radionucleótidos, agregar en el siguiente orden a temperatura ambiente:

-2.0µl de buffer de transcripción 5X

-1.0µl de TDT 100 mM

-1,5 µl de mezcla de ATP, CTP y GTP 3,3 mM

-3.0 µl de UTP 10 µM

-1,0 µg de ADNc (la concentración debe ser de aproximadamente 1µg/µl)

-X µl de agua libre denucleasas para un volumen final de 10 µl

2) Vortexear y centrifugar brevemente para conseguir que todo el contenido pase al fondo del tubo

3) Añadir en orden:

→0.5µl de inhibidor de RNasa (RNAsin a 40,000 Unidades/ml)

→0.5µl de ARN polimerasa

4) Invertir el tubo para mezclar el contenido y centrifugar brevemente para conseguir que todo el contenido pase al fondo del tubo

Incubar durante 30 minutos a 37°C en bloques térmicos.

5) Añadir otra alícuota de 0.5µl de polimerasa e incubar durante 30 minutos a 37°C en bloques térmicos.

6) Añadir, en orden, 0.5µl de RNasin y 0.5 µl de DNAsa (5 U/µl, Roche). Mezclar gentilmente e incubar 10 min a 37°C.

7) Añadir 90µl de TE y 0.5 µl de tRNA (

8) tomar dos alícuotas de 0,5 ml para realizar el análisis de cuentas en la reacción.

9) Hacer una extracción con la mezcla fenol /cloroformo: A) Añadir fenol /cloroformo en un volumen igual al de la reacción de transcripción (100 µl para la reacción completa), vortexear y centrifugar durante dos minutos a velocidad máxima. B) Retirar la fase acuosa (superior), teniendo cuidado de no pipetear de la zona de las proteínas de la interfase, y poner en un tubo nuevo de centrifuga con tapa de rosca libre de RNasas. C) Añadir un volumen igual de cloroformo (100 µl) y agitar vigorosamente, centrifugar dos minutos a velocidad máxima. Pipetear la fase acuosa a un tubo nuevo.

10) Hacer dos precipitaciones de etanol: A) 1/10 vol de NaCl 4 M (10 µl) y 3 volúmenes de EtOH frío. B) Enfriar en hielo seco durante 10 min. C) Centrifugar a 15 minutos a velocidad máxima. Determinar las cuentas de dos alícuotas de 0,5 µl y comparar con los recuentos obtenidos anteriormente para determinar el % de incorporación.

### **3.1.9. Transcripción *in vitro* de sondas marcadas con digoxigenina**

Añadir en el orden siguiente a un tubo estéril de 1.5ml (Sarstedt):

-2 µl de buffer de transcripción 5X (Promega)

-1 µl de dithiothreitol (DTT) 100 mM

-0.5 µl de RNAsin (40 U/l; Promega)

-1.5 µl 3.3mM cada uno de: GTP, ATP, y CTP (Promega)

-1 µl de UTP (Promega) 1mM

-0.5 µl de digoxigenin-UTP (Roche) 10 mM

-1 µl de AND molde linealizado 1 µg/µl

-1 µl de ARN polimerasa (20 U/l; Promega) -

Mezclar gentilmente y centrifugar brevemente (16,000 x g) para pasar el contenido al fondo del tubo, y entonces incubar durante 1 hora a 37°C.

-Añadir 1µl de ARN polimerasa (20 U) e incubar durante una hora adicional.

-Añadir 0.5µl de RNasin (20 u/l; Promega) y 0.5µl de DNAsa (5 U/l; Roche). Mezclar gentilmente e incubar durante 10 minutos a 37°C

-Ajustar el volumen a 100 µl por adición de TE.

-Añadir 1µl de tRNA 25mg/ml.

NO HACER UNA EXTRACCIÓN CON LA MEZCLA FENOL /CLOROFORMO, la digoxigenina es soluble en fenol.

Precipitar la sonda de ARNc añadiendo 10µl de una solución de NaCl 4.0M y 330µl de ETOH al 100%. Vortexear y dejar en hielo seco durante 10 minutos.

Microcentrifugar a 16,000 x g durante 15 minutos.

Decantar el sobrenadante y resuspender el pellete de ARNc en 100µl de TE.

Repetir la precipitación de EtOH añadiendo NaCl y ETOH y enfriando y centrifugando como antes.

Decantar el sobrenadante y resuspender el pellete de ARNc en 50µl de agua DEPC tratada con 0.1% de dodecil sulfato sódico (DSS) y calentar a 37°C durante 10 minutos, vortexear frecuentemente.

Almacenar a -80°C.

Usar 1µl de esta sonda en un volumen total de 25µl buffer de hibridación por cada sección.

### **3.1.9.1. Evaluación de sondas marcadas con digoxigenina**

1. Cortar una pieza de NitroPlusMembrane tan pequeña como sea posible (menos de 1" x 1" si es posible) y poner esta sobre papel de aluminio "nucleasa-libre".

2. Marcar columnas sobre la membrana para diferentes grupos.

3. Poner 0.5µl de diferentes alícuotas de las "sondas" y ARNs control (Roche) sobre la membrana (generalmente: sin diluir, 1:10, 1:100)

4. Hornear la membrana en un horno a 80°C durante 30 minutos.

5. Retirar y colocar en un pequeño contenedor.
6. Añadir suficiente buffer TN para humedecer la membrana.
7. Retirar buffer TN y añadir 5% de MBMB y 0.3% de Triton X-100.
8. Incubar con agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Descartar el 5% de MBMB y añadir anti-dig POD, diluir 1:200 en 2% de MBMB.
10. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente con agitación.
11. Lavar 2 veces en buffer TN (1-5 minutos, agitación).
12. Desarrollar la reacción incubando en solución DAB: tableta de 0.7 mg en 3.5ml de TN + una tableta de urea (o 0.6µl peróxido de hidrogeno en lugar de urea). Cubrir con papel de aluminio.  
Revisar el desarrollo de color cada 2-5 minutos.
13. Parar la reacción por lavado de la membrana en Tris (pH 8.0) 0.1 M o en TN
14. Nota: si la sonda sintetizada no funciona aquí, no funcionará con tejido, pero si funciona, lo hará con tejido.

### **3.1.9.2. Marcado (End-tailing) de sondas de oligodeoxinucleotidos**

Colocar papel absorbente, usar guantes durante el procedimiento.

El volumen de la reacción es de 20 µl

1. Añadir 4µl 5X tailing buffer (Roche) y 1.2µl de la solución de CoCl<sub>2</sub> sin diluir en un tubo de tapa de rosca de 1.5-ml.
2. Añadir 1 µl de oligo (0.083 µg/ µl)
3. Añadir 5.2 µl de <sup>35</sup>S]-dATP (50 pmol). Para <sup>33</sup>P-dATP es necesario liofilizar los nucleótidos.  
No olvidar incluir la decadencia de radioisótopos en los cálculos.
4. Añadir 2 µl de transferasa terminal.
5. Añadir una cantidad suficiente de agua destilada desionizada hasta llegar a un volumen de 20µl.



6. Incubar la muestra durante 15 minutos a 37°C
7. Añadir 30 µl de TE
8. Añadir 1 µl tRNA (25 mg/ml).
9. Añadir 50 µl de solución fenol-cloroformo a la muestra. Vortexear el tubo, después microcentrifugar el tubo durante 2 minutos, y tomar la fase acuosa. Descartar los residuos radioactivos restantes.
10. Añadir 50 µl de cloroformo a la muestra. Vortexear el tubo, centrifugar la muestra durante 2 minutos y después tomar la fase acuosa.
11. Añadir 5 µl de 4M NaCl (1/10 volumen) al tubo. Después añadir 165 µl de 100% ETOH frío al tubo, vortexearlo, y enfriar durante 15 minutos en hielo seco.
12. Centrifugar la muestra a máxima velocidad durante 15 minutos y marcar el pellet con un rotulador.
13. Lavar el pellet cuidadosamente con 1ml de ETOH 70%. Decantar el ETOH en un nuevo tubo para evitar perder el pellet si este está suelto.
14. Reconstituir la muestra con 50 µl de TE, vortexear muy bien.
15. Coger 0.5 µl de esta reacción de marcado por duplicado en un contador de centelleo (vortexear después de ponerlo en solución de centelleo). (Debería haber de 1 a 2 millones cpm/0.5 µl o más)

### 3.2. Prehibridación

Todos los procedimientos se llevarán a cabo usando las precauciones marcadas por el Manual de Seguridad de Radiación.

1. Sacar las secciones con tejido del congelador -80C y colocarlas en papel de aluminio durante 10 minutos.

2. Cargar las secciones en portadores de 100 lugares que estén libres de RNAsas o en jarros de plástico y procesar en las siguientes soluciones:

Utilizar siempre soluciones libres de RNAsas:

15 minutos en PBS/FORMALIN (200 ml 10x PBS, 200 ml 37% formaldehído, con DEPC-H<sub>2</sub>O a 2L)

2 minutos en 2X SSC

10 minutos en trietanolamina con anhídrido acético (125 µl anhídrido acético/50 ml añadidos justo antes de uso)

Lavar rápido en 2X SSC

1 minuto en ETOH 70%

1 minuto en ETOH 80%

2 minutos en ETOH 95%

1 minuto en ETOH 100%

5 minutos en cloroformo (debajo de la capa, no agitar)

1 minuto en ETOH 100%

1 minuto en ETOH 95%

Secar al aire en el retenedor de secciones.

### 3.3. Hibridación

**Nota:** antes de empezar, asegurarse de que el ditiotreitól (DDT) se ha añadido a la sonda en buffer de hibridación (concentración final en buffer: 0.4M de DDT). Deben llevarse guantes durante este procedimiento.

1. Organizar las secciones en el fondo de un plato Nunc Petri cuadrado grande<sup>2</sup>. Añadir buffer de hibridación conteniendo sonda radiomarcada ( $1 \times 10^6$  cpm/25 µl buffer de hibridación) o sonda marcada con digoxigenina (1 µl/25-50 µl buffer de hibridación)
3. Colocar cubre de cristal (22x22 para una sección) sobre el tejido. Asegurarse de que no hay fugas de buffer de hibridación debajo del cubre. Usar 20 µl/sección para evitar fugas.
4. Cubrir el plato Petri e incubar toda la noche (37°C para oligonucleótidos y 55°C para sondas cRNA) en una cámara húmeda (colocar 2 capas de tubos cónicos de 50 ml rellenos con agua desionizada en esquinas opuestas del plato Petri largo). Si se hibridiza por más tiempo, el DDT no será efectivo.

#### 3.3.1. Preparación de Buffer de hibridación para Hibridación In Situ con sondas de ARNc

Composición: 50% formamida, 10% dextran sulfato, 1x solución Denhardt, 2SSC, 500 µg/ml heparina sódica salina, 0.5 mg/ml tRNA, 0.1% pirofosfato sódico.

- En 4.5 ml de NF-H<sub>2</sub>O añadir:

20 mg de pirofosfato sódico (Sigma, S-9514, FW 446.1) vortexear y calentar para disolverlo.

- 2g dextran sulfato (Sigma, D-6001, 500,000 MW)(necesita calentarse en baño de agua de 37°C)
- 10 ml formamida (J.T. Baker, FW 45.04, cat no. 4028, stock a 4°C, descartar después de 6 meses)
- 2 ml 20xSSC
- 200ml de solución Denhardt 100x o 400 ml de solución Denhardt 50x (usada como reactivo)

bloqueante para hibridación en biología molecular)

- 400 µl de tRNA 25mg/ml
- 10 mg de heparina sódica salina (Sigma, H-3393, usada como agente bloqueante para reducir el fondo)
- Ajustar el volumen hasta 20 ml con agua libre de nucleasas, asegurarse de que todos los reactivos se disuelven, almacenar a -20°C.

### **3.3.2. Preparación de Buffer de hibridación para Hibridación In Situ con sondas de oligodeoxinucleótidos**

Preparación de buffer de hibridación para sondas de oligonucleótidos:

- 1) en un tubo de 1.5 ml, disolver 20mg de pirofosfato sódico (NA4P207) en 1.0 ml de agua tratada con DEPC calentando a 37°C y vortexeando.
- 2) en un tubo de 50 ml, añadir lo siguiente: 2g de dextran sulfato, 10 ml formamida, 4 ml 20xSSC (que se ha hecho con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas), 200 tRNA (25 mg/ml), 400 µl de solución Denhardt 50X, 1.0 ml de solución de pirofosfato sódico preparada en los pasos 1)
- 3) Cantidad suficiente de agua libre de nucleasas hasta 20 ml; vortexear y guardar a -20°C

### **3.3.3. 20XSSC**

- 350 de NaCl
- 176.4 g de citrato de Na
- H<sub>2</sub>O hasta 1.6L
- pH a 7.0 con 10M HCl
- Ajustar volumen a 2L
- Añadir 2 ml DEPC, dejar reposar toda la noche y autoclavar

### **3.3.4. 10XPBS**

En 1.8 L DEPC-H<sub>2</sub>O

- 160g NaCl (PM 58.44)
- 28.8g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PM 142.0)
- 4g KCl (PM 74.56)
- 4.8g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PM 136.09)

Usar DEPC-H<sub>2</sub>O hasta 2L de

Ajustar pH a 7.4, y autoclavar

### **3.4.Lavados post-hibridación para sondas de ARNc.**

1. Dejar enfriar las secciones a temperatura ambiente y retirar el cubre de vidrio en solución 1XSSC. Tener mucho cuidado de no rascar el tejido de la sección, cuando el cubre sea retirado, retirarlo, y colocar la sección en una cubeta de precipitación de plástico de 400ml con 1XSSC y moverla hacia adelante y hacia atrás vigorosamente, repetir en otra cubeta de precipitación y después repetir el lavado en una tercera cubeta. Colocar la sección en una estantería de secciones dentro de una cubeta o en una jarra que contenga suficiente 1XSSC para cubrir las secciones de tejido.
2. Lavar las secciones dos veces en 1XSSC a temperatura ambiente durante 15 minutos en un agitador orbital (~60rpm)
3. Lavar las secciones dos veces en solución recién preparada de 50%formamida/2XSSC (x ml formamida + x ml de 4XSSC; x ml formamida + 0.1x ml 20XSSC + 0.9x ml dH<sub>2</sub>O) durante 20 min a 52°C (poner las cubetas en baño de agua).
4. Enjuagar dos veces en 2XSSC a temperatura ambiente durante 10 minutos cada vez en un agitador.
5. Incubar las secciones en buffer de RNasa con 25 µg/ml RNasa A a 37°C durante 30 minutos en

agitador (60 rpm) (es necesario precalentar). **Usar un set de pipetas y contenedores distinto para dispensar la solución de RNAsa.**

. Hacer esta solución en jarras o “cubetas” marcadas para RNAsas. Usar el baño de agua con agitador reservado para soluciones contaminadas con RNAsas. Poner los guantes en la papelera después de usarlos (RNAsa: Roche #109 169, RNAsa A). Buffer de RNAsa (0.5 M NaCl, 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0): mezclar 200 ml de 5 M NaCl, 20 ml de 1 M Tris (pH 8.0), 4 ml de 0.5 M EDTA, después ajustar el volumen a 200ml con agua desionizada. Disolver 100mg de RNAsa A en 1 ml de H<sub>2</sub>O y añadir 1 µl por cada 4ml de buffer de RNAsa que se utilizaran.

Hacer 450 ml en total, coger 1.125 ml de RNAsa stock 10mg/ml a -20°C (RNAsa en polvo, hacer 10mg/ml en buffer de 15 mM NaCl Tris con pH 7.5; dividir en alícuotas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con junta. Hervir siguiendo los pasos indicados para deshacerse de la actividad de la proteinasa.

6. Enjuagar una vez en 2XSSC a temperatura ambiente durante 10 minutos
7. Incubar durante 10 minutos a 52°C en 50% formamida/2XSSC.
8. Lavar las secciones en 2XSSC a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitador.
9. Brevemente enjuagar en H<sub>2</sub>O desionizada.
10. Lavar las secciones en EtOH al 70% durante 1 minuto
11. Lavar las secciones en EtOH al 80% durante 1 minuto
12. Lavar las secciones en EtOH al 95% durante 1 minuto

### **3.4.1. Lavados post-hibridación al utilizar sondas de oligodeoxinucleótidos.**

Colocar papel absorbente sobre la encimera. Preparar 4 cubetas de precipitación de 500 ml de 1XSSC (diluir en agua desionizada la solución 20X SSC) a temperatura ambiente y retirar el cubre levantando una esquina ayudándose en la extracción de un fórceps de dientes finos. Lavar las

secciones varias veces sumergiéndolas y agitándolas vigorosamente en las cubetas de 500 ml conteniendo 1XSSC. Repetir el procedimiento 3 veces más. Después lavar las secciones durante 20 min colocándolas en cubetas con solución 1XSSC recién preparada en agitador orbital. Tirar la solución de lavado a la pila y dejar correr el agua.

2. Lavar cada sección 4 veces durante 15 minutos cada vez en 2XSSC-solución 50% formamida a 40°C.
3. Lavar las secciones 4 veces durante 15 minutos cada vez en 1XSSC a temperatura ambiente.
4. Brevemente, empapar las secciones en H<sub>2</sub>O.
5. Incubar las secciones durante 5 minutos en ETOH al 70% y dejar secar al aire.

### **3.5.Detección con anticuerpos de sondas marcadas con digoxigenina**

#### **3.5.1. Detección sin tiramina biotinilada.**

1. *(Retirar Clips de Sonda de las secciones, y colocar las secciones en porta-secciones. Lavar el anticuerpo una vez en buffer maleato, después una vez en buffer TN, durante 5 minutos cada vez en un agitador orbital a 80 rpm. Para limpiar los clips de sonda: empaparlos en una disolución débil de Versa-Clean (no dejar los clips secarse con antisueros en ellos, colocarlos directamente en esta solución) Enjuagar en agua milliQ. Si los clips tienen una película sobre ellos, limpiarlos con ETOH al 70% usando una Kimwipe. Dejar secar entre toallas de papel.*
2. Lavar en buffer TNT durante 5 minutos en agitador.
3. Eliminar el exceso de TNT en toallas de papel. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente en tiramina biotinilada (bt) diluida 1:250 en TNT.
4. Lavar 3 veces, durante 3 minutos cada vez en TNT.
5. Secar las secciones sobre papel de cocina. Incubar en reactivo ABC (2.5 µl de cada solución A y

B del kit Elite ABC por ml de TNT) durante 30 minutos a 37°C usando Clip de sonda y 200-225 µl de reactivo ABC por sección.

6. Retirar clips de sonda. Lavar 3 veces, durante 3 minutos cada vez en TNT en porta secciones.

7. Repetir los pasos 3 a 6 si es necesario.

8. *Mezclar y filtrar (Whatman #1) una tableta (10 mg) de DAB (Sigma D5905) en 50 ml de buffer TNT. Usar un tubo cónico de 50 ml, vortexear la solución vigorosamente y cubrirla con papel de aluminio.*

9. Añadir 8µl de solución de peróxido de hidrogeno al 30% en el tubo de 50 ml que contiene la solución DAB. Vortexear solución.

10. Secar las secciones sobre papel de cocina y transferirlas a porta secciones de plástico. Añadir la solución DAB-peróxido de hidrógeno a los porta secciones e incubar las secciones en un agitador orbital de 20 minutos a 3 horas (dependiendo de la señal y del fondo).

11. Comprobar la tinción con microscopio: enjuagar en 0.1 M Tris (pH 7.6) y secar el reverso y los bordes de las secciones antes de colocarlas en la platina del microscopio.

12. Detener la reacción cuando la tinción es claramente visible (o el fondo comienza a aparecer), enjuagando en 0.1 M Tris (pH 7.6) en el porta secciones durante 1 minuto.

13. *Enjuagar rápidamente en H<sub>2</sub>O. Si se deja demasiado tiempo en este paso la señal se debilitara*

14. Lavar en ETOH al 70% durante 3 minutos en el porta secciones.

15. Secar en porta secciones cubierto de kimwipes.



### 3.5.2. Amplificación con tiramida biotinilada.

1. Retirar los clips de sonda de las secciones, y colocar las secciones en porta secciones. Lavar el anticuerpo una vez en buffer maleato, después una vez en buffer TNT, durante 5 minutos cada una en agitador orbital a 80 rpm.

*Para limpiar los clips de sonda: empaparlos en una disolución débil de Versa-Clean (no dejar los clips secarse con antiseros sobre ellos, colocarlos directamente en esta solución) Enjuagar en agua milliQ. Si los clips tienen una película sobre ellos, limpiarlos con ETOH al 70% usando una Kimwipe. Dejar secar entre toallas de papel.*

2. Lavar en buffer TNT durante 5 minutos en agitador.

3. Eliminar el exceso de TNT en toallas de papel. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente en tiramida biotinilada diluida 1:250 en TNT.

4. Lavar 3 veces, durante 3 minutos cada vez en TNT.

5. Secar las secciones en toallas de papel. Incubar en reactivo ABC (2.5 µl de cada solución A y B del kit ABC Elite por ml de TNT) durante 30 minutos a 37°C utilizando clips de sonda y 200-225 µl de reactivo ABC por sección.

6. Retirar los clips de sonda. Lavar tres veces, 3 minutos cada vez en TNT en porta secciones.

7. Repetir los pasos 3-6 si se desea o es necesario.

8. Mezclar y filtrar (Whatman #1) una tableta (10mg) de DAB (Sigma D5905) en 50 ml de buffer TNT. *Usar un tubo cónico de 50 ml, vortexear la solución vigorosamente y cubrir con papel de aluminio.*

9. Añadir 8µl de una solución de peróxido de hidrogeno al 30% al tubo de 50ml que contiene la solución DAB.

10. Secar las secciones en toallas de papel y transferirlas a porta secciones de plástico. Añadir la solución DAB-peróxido de hidrogeno al porta secciones e incubar las secciones en un agitador

orbital de 20 minutos a 3 horas (dependiendo de la señal y del fondo).

11. Comprobar la tinción con microscopio: enjuagar en 0.1 M Tris (pH 7.6) y secar el reverso y los bordes de las secciones antes de colocarlas en la platina del microscopio.

12. Detener la reacción cuando la tinción es claramente visible (o el fondo comienza a aparecer), enjuagando en 0.1 M Tris (pH 7.6) en el porta secciones durante 1 minuto.

13. Enjuagar rápidamente en H<sub>2</sub>O. Si se deja demasiado tiempo en este paso la señal se debilitará

14. Lavar en ETOH al 70% durante 3 minutos en el porta secciones.

15. Secar en porta secciones cubierto de kimwipes.

### **3.6. Autorradiografía.**

#### **3.6.1. Autorradiografía de rayos X.**

1. Limpiar el cassette de rayos X de polvo y cualquier residuo.

2. Colocar una pieza de papel (de láminas de rayos x previamente utilizadas) en el cassette.

Asegurarse de que reposa llano en el cassette.

3. Alinear las secciones dentro del cassette en el papel. Pegar con celo sobre toda la fila de secciones, asegurándose de evitar el tejido. Además, asegurarse de que las secciones están completamente llanas o la posición de la película variara a lo largo de las secciones.

4. Llevar el cassette preparado, la caja de películas cerrada y la bolsa negra del cassette a la habitación oscura.

5. En la oscuridad, abrir la caja de películas Biomax MR y colocar la película contra las secciones, de forma que el lado de emulsión (lado opaco) este de cara a las secciones. Asegurarse de que la luz de seguridad este al menos a 1.5 metros de distancia cuando se está trabajando con la película.

6. Cerrar la caja de película y sellarla

7. Cerrar el cassette de películas y colocarlo en la bolsa negra. Asegurarse de que todo está bien cerrado antes de encender las luces.

8. Marcar fuera de la bolsa la fecha, nombre y sonda usada.

9. Colocar el casete en la estantería y dejarlo reposar el tiempo de exposición que se estima necesario.

10. Revelar en el procesador automático en la habitación oscura.

\* Es una buena idea colocar las secciones contra la película incluso si se está haciendo doble marcado ISHH. De esta manera se pueden emparejar neuroanatómicamente los animales a través de las secciones.

### **3.6.2. Emulsión autoradiográfica**

Para examinar los niveles de ARNm en células individuales en marcado simple o doble ISHH, las secciones se sumergen en emulsión de trazas nucleares. Aunque Kodak dice que la emulsión NTB2 es más sensible que la NTB3, los granos que resultan de la exposición a la primera son más finos y más difíciles de ver. Por tanto, utilizamos la emulsión NTB3. La emulsión se diluye 1:1 con agua desionizada, destilada y filtrada (esto debe hacerse en la oscuridad con material de cristal que este absolutamente limpio- cualquier polvo o partícula provocara fondo)

*Para diluir la emulsión, fundirla colocando el contenedor en un baño de agua a 42°C en la habitación oscura. Calentar 120ml de agua a 42°C y mezclarla con la emulsión. Revolver suavemente para mezclar completamente. Dividir en alícuotas la emulsión diluida en tubos cónicos recubiertos de cinta aislante negra y luego papel de aluminio. Marcar los tubos y guardarlos refrigerados en un contenedor de metal aislado de fuentes de radiación.*

Cargar las secciones en cajas estancas negras y llevarlas a la habitación oscura.

Para sumergir las secciones, calentar los tubos de emulsión diluida a 42°C en un baño de agua en la habitación oscura bajo las condiciones de luz arriba indicadas. Cuando la emulsión este a 42°C, verter una alícuota en el Dipmister, evitando la formación de burbujas de aire (esto es muy importante).

Dejar reposar la emulsión 5 minutos para que se disipe cualquier burbuja de aire.

Sumergir las secciones individualmente en la emulsión, colocar el final de la sección en papel secante, y secar la emulsión del reverso de la sección con una kimwipe.

Colocar las secciones en bandejas cubiertas con papel de aluminio y dejarlas secar de 1 a 2 horas en la oscuridad. Las secciones deben estar completamente planas para que la capa de emulsión este uniforme sobre las secciones-esto es crítico para los estudios cuantitativos. Después del secado, volver a colocar las secciones en las cajas negras con tabletas desecantes. No colocar las tapas en la caja, en su lugar, asegurar las secciones en sus posiciones colocando don bandas elásticas alrededor del fondo de la caja que contiene las secciones. Colocar las cajas en el extremo, con las secciones de tejido paralelas al suelo (lado de la emulsión hacia arriba), en un recipiente de metal que tenga desecante cubierto con capas de Kimwipes. Cubrir la caja de metal y dejar las secciones secar toda la noche.

Por la mañana, quitar las bandas elásticas, colocar las tapas en las cajas (asegurándose de que las capsulas desecantes están presentes) y cerrar las cajas con cinta aislante. Envolver las cajas en papel de aluminio para protección extra.

Colocar las cajas en un contenedor de metal a 4°C en una nevera libre de fuentes de radiación.

Revelar las “secciones de prueba” en intervalos para determinar los tiempos de exposición apropiados y después revelar.

Para revelar las secciones, cargarlas en estantes de plástico (no acero inoxidable) y colocar contenedores de Dektol (diluido 1:1 con agua destilada y desionizada) agua destilada y desionizada y

Fixer en hielo hasta que estén a 15C. Esto es CRÍTICO. Temperaturas más frías no son óptimas para el revelado y temperaturas más calientes provocan que la emulsión se fluidifique.

Sumergir en revelador Dektol durante 2 minutos. Transferir a agua durante 30 segundos y después en Fixer durante 5 minutos. NO AGITAR las secciones durante el revelado. No usar nunca RapidFix porque blanquea los granos de plata.

## **4. CULTIVO CELULAR.**

### **4.1. Preparación del medio de cultivo.**

#### **4.1.1. Extracción de componente del suero con resina.**

Este procedimiento está diseñado para retirar las hormonas tiroideas (L-T3y L-T4) del suero bovino fetal utilizando una resina de intercambio de aniones (AG-1X-8 de BioRad). Como siempre, un proceder estéril es muy importante. Trabajar en la campana de cultivo celular, y mantener los tubos fuertemente cerrados al retirarlos de la campana.

1. Colocar 2.5 g de resina en cada uno de dos tubos de 50 ml Falcon.
2. Añadir agua autoclavada o calentada en microondas a cada tubo (~20 a 25 ml), agitar, y centrifugar a 100g. Decantar el agua y repetir dos veces.
3. Añadir 50 ml de FBS a un tubo. Agitar durante 5 horas a temperatura ambiente.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 1000G. Verter el sobrenadante en el segundo tubo.
5. Incubar la mezcla FBS/resina de 15 a 18 horas a temperatura ambiente.
6. Centrifugar durante 10 minutos a 1000G.
7. Centrifugar sobrenadante durante 10 minutos a 30,000G.
8. Filtrar-esterilizar sobrenadante con un filtro de 0.2 micras antes de usar.

#### **4.1.2. Extracción de componentes del suero con carbón activo.**

Este procedimiento está diseñado para eliminar los estrógenos del suero fetal bovino (SFB). Nótese que este procedimiento no eliminara completamente los estrógenos del suero, como tampoco debería asumirse que eliminara otros esteroides u hormonas.

1) Preparar la solución sacarosa/MgCl<sub>2</sub>/HEPES (SMH) (0.25M sacarosa, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES). Para una solución de 500 ml, añadir los siguientes componentes a 250 ml de agua destilada:

-42.75g sacarosa (Fisher BP220-1)

-1.19g HEPES (Sigma H4034)

-750µl 1M MgCl<sub>2</sub>

- Ajustar volumen final a 500ml con H<sub>2</sub>O destilada

- Autoclavar

2) A los 500ml de solución SMH, añadir 1.25g de carbón activo (Sigma C3345 o C9157) y 0.0125g de dextrano (Sigma D1390). Ajustar pH a 7.4. Incubar toda la noche a 4°C°, revolviendo continuamente.

3) Decidir cuánto SFB debe filtrarse. Tomar un volumen equivalente de carbón tratado (carbón recubierto de dextrano o DCC) y centrifugar a 500g durante 10 minutos para sedimentar el carbón.

4) Decantar el sobrenadante. Añadir el SFB al carbón sedimentado. Vortexear concienzudamente para mezclar el carbón con el suero. Incubar 12 horas a 4°C removiendo constantemente.

5) Centrifugar el SFB a 1000g durante 1 hora para sedimentar el carbón. Repetir con el sobrenadante.

### **Medio al 10%**

Usar para células COS-7, puede usarse para la mayoría de líneas celulares. Células GT1-7 pueden crecer en medio 10%, pero se recomienda medio F12.

En una botella de 500ml de Medio Eagle modificado de Dubelco (DMEM) añadir:

-55 ml de suero fetal bovino (SFB, Sigma-2442)

-5.5ml de penicilina/estreptomicina/glutamina (PS-Gln)(Gibco 0449)

Agitar suavemente, y filtrar la botella entera usando un filtro de 0.2 micras.

Marcar la botella con los siguientes datos:

Medio 10%, 10% SFB, 1% PS-Gln, [Fecha del día]

Llenar un solo tubo Falcon de 50ml con el medio. Al trabajar con los cultivos celulares, tomar el medio del tubo de 50 ml, NO de la botella de 500ml (hacer esto facilita evitar la contaminación). El tubo Falcon debe estar marcado de la misma manera que la botella

El medio 10% puede guardarse a 4°C hasta 2 meses

### **4.2. Pase de células.**

Este procedimiento está escrito para el sembrado de células en placas de 100mm. Si se usa un matraz T-25, usar los volúmenes entre paréntesis.

1. Lavarse las manos con etanol al 70% frecuentemente. Se deben utilizar guantes pero aún así es necesario lavarse las manos con EtOH.
2. Controlar la confluencia de las células. Retirar la placa del incubador y colocarla en el microscopio de contraste de fase. Las células deberían parecer adherentes, es decir, con forma irregular y firmemente unidas a la placa. Si las células están a menos del 70% de confluencia (es decir, si cubren menos del 70% de la placa) considerar esperar un día.

3. Si las células están confluentes, devolverlas a la incubadora y prepararse para el pase.

❖ Sacar el buffer de fosfato salino (BFS), el medio 10% y la tripsina de la nevera a 4°C.

Colocarlos en un baño de agua a 37°C para calentar. (Todas las soluciones deben estar en tubos Falcon de 50 o 15 ml. Si no es así, reponer en la campana después de haberla limpiado)

❖ Preparar la campana de cultivos. Apagar la luz UV, encender la luz normal. Encender el aspirador. Lavar

### **4.3. Descongelado de células.**

Preparar medio 20% (usar solo cuando se descongelan células)

En un tubo Falcon de 50ml, añadir lo siguiente:

-16ml DMEM

-4ml FBS

-0.2 ml penicilina/estreptomicina/glutamina.

Esta cantidad es suficiente para descongelar un vial de células. Descartar cualquier medio sobrante.

1) Preparar la campana. Limpiar concienzudamente, como para el sembrado de células. Colocar un tubo Falcon de 15ml, un tubo de 50ml y una placa de cultivo (o un T-flask) en la campana. Marcar la placa con la línea celular, la fecha, nombre, cualquier información de tratamiento y el número de pase (que se encuentra en el crioflask)

2) Hacer el medio 20% en un tubo de 50ml: 16ml DMEM, 4ml SFB (Filtrado), 0.2 penicilina/estreptomicina/glutamina. Nota: También se puede utilizar medio 10% normal.

3) Poner 5ml del medio 20% en el tubo de 15ml. Poner 7 ml en la placa y tapar.

4) Sacar el criotubo del nitrógeno líquido. Rápidamente poner en baño de agua a 37°C. Sostener el tubo por la tapa y agitarlo en el baño para promover el descongelado. Cuando quedan pequeños cristales de hielo (sobre el tamaño de tu uña más pequeña), retirar del baño.



- 5) Lavar el criotubo con etanol al 70%
- 6) Recordar escribir el número de pase del criotubo en la tapa
- 7) Colocar una pipeta Pasteur de 2 ml (sin algodón) a una bombilla de pipeta. Pipetear el contenido del criotubo para mezclar a fondo.
- 8) Pipetear el contenido entero del criotubo en el tubo Falcon de 15ml (con 5 ml de medio). El criotubo puede tirarse a la basura (si las células son inocuas) o en el cubo de riesgo biológico (si las células son peligrosas). Las pipetas Pasteur van al cubo de cristales.
- 9) Centrifugar el tubo de 15ml durante 5 minutos.
- 10) Colocar la pipeta Pasteur en la manguera del aspirador, y cuidadosamente aspirar el medio del tubo de 15 ml. Tener cuidado de no aspirar el pellet
- 11). Pipetear el medio 20% restante (~8ml) en el tubo Falcon de 15ml con el pellet. Pipetear arriba y abajo para resuspender el pellet.
- 12) Pipetear el contenido completo del tubo de 15ml en la placa. Cubrir esta y hacer una cruz de la solución en la placa, y poner la placa en la incubadora.
- 13) Limpiar, como para pase de células.
- 14) Dejar las células toda la noche y revisarlas a la mañana siguiente. Si hay muchas células muertas, cambiar el medio. Aspirar el medio antiguo; añadir 4ml PBS, aspirar el PBS; añadir 12ml de medio 10%. Se pueden hacer dos lavados de PBS si hay mucha cantidad de células muertas.

## **4.4. Ensayos para la medida de la actividad transcripcional.**

### **4.4.1. Búsqueda de secuencias en las regiones promotoras de los genes.**

- 1) Ir a la página web NCBI y buscar la secuencia que se tiene que buscar
- 2) Extraer una secuencia y grabar el número gi (o el número AF).
- 3) Para encontrar la región de codificación, hacer una búsqueda PairwiseBlast de pares (que asume que no se posee la secuencia y desconoce dónde termina el promotor)
  - a. Ir a NCBI para la búsquedaBlast.
  - b. Ir a PairwiseBlast y Blast 2 secuencias.
  - c. Introducir número gi en las solicitudes de secuencia 1 y 2.
  - d. Bajar la secuencia hasta encontrar donde se muestran los aminoácidos (sitio de inicio de la traducción)
  - e. Averiguar el número de bases del comienzo de la secuencia de aminoácidos.
- 4) Volver a otra ventana en que se encuentre la secuencia y cortar y pegar la región de interés (es decir, la secuencia del promotor). Hacer una búsqueda de la secuencia de interés en la región promotora.

### **4.4.2. Construcción de plásmidos.**

Las regiones promotoras de genes de interés son amplificadas por PCR de ADN de rata y clonadas en vector Básico pGL3 (Promega), que contiene el gen reportero de luciferasa de luciérnaga. Un plásmido control nulo es un vector de control pGL3 alterado para eliminar una secuencia DRE endógena. PhRL-CMV (Promega) sirve como un control interno para la eficacia de transfección en los ensayos de luciferasa duales.

#### **4.4.3. Transfecciones transitorias.**

Las células MCF-7 y Cos7 se mantienen en medio DMEM (Life Technologies) complementado con suero fetal bovino 10%, antibióticos y 1µg/ml de insulina como se ha descrito anteriormente. Las otras líneas celulares se mantienen en medio que optimice su crecimiento.

Las Transfecciones que utilicen reactivo Superfect (Qiagen) se llevan a cabo según los protocolos del fabricante.

Veinticuatro horas antes de la transfecciones, las células se sembraran para tener una densidad de confluencia de 40-80%

El día de la transfección las células se lavaran en PBS y medio sin antibióticos o suero añadidos. El plásmido y el reactivo Superefect se añaden en volúmenes apropiados para el tamaño del cultivo y del experimento en particular sugeridos por el fabricante. Un ratio de 5µg de plásmido construido con el promotor a 0.16µg de plásmido control interno de luciferasaRenilla se considera optimo en estas células

Dieciocho horas después de la transfección, las células serán tratadas con sustancias que se probaran para activación transcripcional.

*Por ejemplo: 10nM E2 y/o 10nM TCDD o vehículo y mantenidos en medios que carecen de fenol rojo y complementados con suero filtrado con carbón activo durante un periodo de 48 horas antes de recolectar para el Ensayo dual de Luciferasa (Promega)*

#### **4.4.4. Ensayo Dual de la luciferasa.**

Las células se lisan y los lisados se analizan usando un luminometro Turner Designs TD 20/20 usando el kit Luciferasa dual de Promega. La actividad luminiscente de la luciferasa, normalizada por la actividad luciferasaRenilla proporcionada por la medida de la actividad del promotor del

plásmido de control interno en los diversos tratamientos. Todas las transfecciones y ensayos deben realizarse por triplicado.

## 5. INMUNOHISTOQUIMICA.

### 5.1. Fijación por perfusión

#### 5.1.1. Reactivos

→ **4.0% paraformaldehído en 0.1 M buffer fosfato:**

5.56g de fosfato sódico (dibásico; PM 142), 21.83g de fosfato sódico (monobásico, PM 120) en 1750ml de H<sub>2</sub>O. Calentar a 60-63°C en plato calefactor con agitador magnético. Añadir 80 paraformaldehído. Apagar el calor. Agitar de 2 a 3 horas. Es probable que no todo el paraformaldehído se diluya en la solución. Algo de polvo en el fondo del contenedor es aceptable. Ajustar la solución a 200ml con H<sub>2</sub>O y **filtrar**. El pH debe ser 7.2-7.3. Se puede ajustar con NaOH/HCL. Almacenar a 4°C. **NOTA: Todo el proceso debe llevarse a cabo en la campana. El paraformaldehído sólido es un polvo fino que se extiende con facilidad. Es muy tóxico. NOTA: la solución de paraformaldehído usada para perfusiones debe hacerse fresca y no debe usarse después de 48 horas.**

→ **0.9% solución salina en 0.1 M buffer fosfato:**

Preparar 0.1M de buffer de fosfato como se ha descrito anteriormente (calentar no es necesario), añadir NaCl para hacer la solución 0.9% para el volumen deseado.

→ **30% Solución de sacarosa en 0.1M buffer fosfato (guardar a 4°C°) NOTA: se necesitará mucho 0.1M buffer de fosfato a lo largo de este proceso, es útil hacer una solución stock.**

### 5.1.2. Equipamiento

- Bomba de infusión motorizada
- Aguja de jeringa del calibre 23
- Cacerola de colección grande
- Malla de alambre grueso
- Instrumentos quirúrgicos variados

### 5.1.3. Preparación.

**Anestesia y preparación del animal:** Inyectar al animal i.p. con pentobarbital sódico (40mg/kg peso corporal) **Esperar hasta que el animal se muestre insensible a estímulos táctiles (pinchazo de aviso en pie/pinchazo en cola).** Encontrar el vértice del esternón (montículo redondeado en la parte inferior, el centro de la caja torácica). Tire de la piel sobre la zona y con unas tijeras quirúrgicas hacer una incisión hacia abajo con cuidado de no cortar el hígado. Continuar la incisión tanto en el lado izquierdo y derecho del animal a justo por debajo de las patas delanteras (toda la incisión es en forma de U). Usando pequeñas tijeras quirúrgicas, cortar lejos del diafragma. Afianzar una gran pinza hemostática en el centro del esternón y utilizando su peso, doblar hacia atrás la caja torácica para exponer el corazón.

**Perfusión:** Traspasar la rata a la campana y colocarla sobre la malla de alambre grueso que cubre la cacerola de colección. Unir la aguja de calibre 23 a la manguera de salida de la bomba de infusión y colocar la manguera de entrada en el contenedor de la solución salina al 0.9%. **Con cuidado** insertar la aguja (solo unos pocos milímetros de la punta) en el ventrículo izquierdo teniendo cuidado de no atravesar el septum. MANTENER LA AGUJA EN POSICION DURANTE TODA LA PERFUSION.

## **6. Radioinmunoensayo**

### **6.1. Procedimiento de ensayos de LH**

#### **6.1.1. Soluciones de radioinmunoensayo de LH**

##### **-LH RP-3 (NIASSK-rLH-RP-3)(asegurarse de que el vial contiene 5µg)**

Añadir 0.5ml de agua desionizada y destilada a un vial. Esto produce una solución de 10µg/ml. Poner alícuotas de 25µl en los crioviales y guardarlos a -80°C. RP-2 es 61 veces más potente que RP-1, así que los valores serán 1/61 de los anteriormente descritos.

##### **-Anticuerpo anti-ovino LH CSU 120**

Diluir la solución madre con 10ml de agua desionizada y destilada para producir una dilución 1:400 en 0.05M EDTA-PDBS. Poner alícuotas en crioviales (0.25 o 0.5ml) y guardarlo a -80°C. Usar dilución de 1:20,000 inicialmente. Esto provee una dilución final de 1:100,000.

#### **6.1.2. Solución LH RIA**

#### **6.1.3 Preparación de curva standard kit LH RIA**

##### **Dilución stock:**

25µl LH RP-3 (250ng) + 225 µl PBSA = 1ng/µl; vortexear.

##### **Solución A:**

75µl stock dilución + 675µl PBSA = 0.1 ng/µl; vortexear

##### **Solución B**

50µl Solución A + 450µl PBSA = 0.01 ng/µl; vortexear

**Solución C:**

25µl Solución B + 225µl PBSA = 0.001 ng/µl; vortexear

<b>6.1.4. Protocolo 500-µlRIA Estándar</b>	<b>Tubo n°</b>	<b>PBSA(µl)</b>	<b>Volumen (µl) a añadir</b>
<b>Fondo</b>	1,2,3	150	NRS 100µl
<b>Recuento total</b>	4,5	0	0
<b>Limite total</b>	6,7,8	150	0
<b>0.04 ng/tubo</b>	9,10,11	110	40/Solución C
<b>0.06 ng/tubo</b>	12,13,14	144	6/Solución B
<b>0.08 ng/tubo</b>	15,16,17	142	8/B
<b>0.10 ng/tubo</b>	18,19,20	140	10/B
<b>0.15 ng/tubo</b>	21,22,23	135	15/B
<b>0.25 ng/tubo</b>	24,25,26	125	25/B
<b>0.40 ng/tubo</b>	27,28,29	110	40/B
<b>0.60 ng/tubo</b>	30,31,32	144	6/A
<b>0.80 ng/tubo</b>	33,34,35	142	8/A
<b>1.20 ng/tubo</b>	36,37,38	138	12/A
<b>Muestras</b>	39...		
<b>25µl Suero</b>		125	0
<b>50µl Suero</b>		100	0

### **6.1.5. Diluciones de anticuerpos de LH**

El tubo stock está a una concentración 1:70 (diluido como dirigido)

Para conseguir una dilución de trabajo de 1:150,000, mezclar 1µl de anticuerpo madre (1:70) y 2, 124µl PBSA

Para conseguir una dilución final de 1:750,000 en el ensayo de 500µl, añadir 100µl de la dilución 1:150,000

Para conseguir una dilución final de 1:750,000 en el ensayo de 1000µl, añadir 200µl de la dilución 1:150,000

### **6.1.6. Diluciones de CSU 120 de anticuerpos de LH**

La dilución madre es 1:400

Para conseguir una dilución de 1:24,000, añadir 1µl de madre a 59µl de PBSA

Para conseguir dilución final de 1:120,000, añadir como dirigido para el buffer de ensayo.

### **6.1.7. Procedimiento para ensayo de 500-µl**

Día 1: Añadir suero/muestras de plasma (100µl máximo) más buffer (PBSA) al total de 150µl

Añadir 100µl de anticuerpo (NIH kit; anti-rLH S11; dilución de funcionamiento 1:150,00 en PBSA; la dilución final es 1:750,000)

Día 2: Añadir 50µl de trazador radioactivo en PBSA (10,000 cpm/tube) (competidor-125-LH) a todos los tubos.

Día 3: Añadir 200µl del segundo anticuerpo (anticonejo-cabra gamma globulina, ARGG, diluido 1ml ARGG+74ml PBSA). No añadir al total de tubos (tubos 4, 5)

Día 4: Incubación



Día 5: separar tubos 4 y 5

-Añadir 2ml PBS a todos los otros tubos

- Centrifugar, vaciar los tubos y contar el precipitado en los tubos restantes

- Centrifugar en centrífuga con rotor con cubeta oscilante; 3200 rpm durante 45 minutos a 4°C

- Contar en contador gamma.

### **6.1.8. Procedimiento para ensayo de 1000-μl**

Día 1: Añadir suero/muestras de plasma, más buffer a los 500μl de volumen total.

- Añadir anticuerpo (200 μl; 1:150,000 dilución de trabajo; 1:750,000 dilución final)

Día 2: Añadir el marcador (100μl; 20,000 cpm)

Día 3: Añadir ARGG (200μl, 1:75)

Día 5: Añadir 2ml de PBS a todos los tubos excepto los tubos 4 y 5.

- Centrifugar, vaciar y contar los tubos.